

• 研究简报 •

刀额新对虾和日本囊对虾细胞核 DNA 含量的测定与比较

方旅平, 张馥厚, 曹文清, 林元烧

(厦门大学海洋学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 以刀额新对虾 (*Metapenaeus ensis*)、日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 的血淋巴为材料, 以小鸡血细胞核 DNA 含量 ($2.50 \text{ pg}/2c$) 为参照样, 使用 Partec PA-I 型倍性分析仪并结合外标定法, 分别测定了刀额新对虾与日本囊对虾细胞的 DNA 含量。结果表明, 这两种虾的细胞 DNA 含量分别为小鸡血细胞的 1.77 倍和 1.95 倍, 换算成绝对含量分别为 $4.340 \text{ pg}/2c$ 和 $4.878 \text{ pg}/2c$ 。本文讨论了刀额新对虾与日本囊对虾以形态学为特征的分类系统与细胞 DNA 含量之间的关系, 并推测在系统演化上日本囊对虾应比刀额新对虾更为高等。

关键词: 刀额新对虾; 日本囊对虾; 细胞核 DNA 含量

中图分类号: Q 52

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2007)01-0146-03

脱氧核糖核酸(DNA)是绝大多数生物的遗传物质。一个细胞核中所含的 DNA 总量(称为 $2C$ 或 2 倍体的 DNA 总量)对于某物种是一定的, 从而使得 DNA 含量可以作为宏观甄别物种的特征性参数。生物 DNA 含量的研究不仅是研究物种间差别的重要方法, 而且对分类和系统演化的探讨、物种进化研究等具有参考意义, 也是种质资源和种质质量的主要指标之一。

日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 属甲壳纲, 十足目, 对虾科, 囊对虾属, 为广温性种类, 自然分布比较广泛, 是我国东海和南海的主要经济虾类。刀额新对虾 (*Metapenaeus ensis*) 属甲壳纲, 十足目, 对虾科, 新对虾属, 主要分布于福建、广东、海南、广西沿海, 浙江也有少量, 是南海较为重要的经济种类。有关对虾科种类的细胞遗传学的研究较少, 特别是有关细胞核 DNA 含量的报道不多^[1-3], 在我国已见报道的种类只有刀额新对虾^[4]。因此, 本研究通过拓展和提升 Partec PA-I 倍性分析仪功能, 对这两种经济虾类进行细胞核 DNA 含量的测定, 不仅为其它经济海产虾类的 DNA 含量的测定奠定基础, 而且对今后开展该类群生物的分子生物学研究及染色体组工程育种研究均具有科学参考意义。

1 材料与方法

收稿日期: 2005-11-01

基金项目: 厦门大学科技创新工程基金(2004xdcx204)资助

E-mail: lpfang@xmu.edu.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.1 材料来源

刀额新对虾与日本囊对虾均购于厦门市场, 购买后暂养于过滤海水中。小公鸡购于厦门市场。

1.2 鸡血参照样的制备

取鸡血后 1% 肝素生理盐水溶液抗凝, 置于 1.5 mL eppendorf 管中, 加入 PBS 溶液 (pH 7.40), 离心 5 min (4°C , 300 r/min), 弃上清液; 离心过程重复操作 2 次。将收集的细胞加入 1 000 μL ACD 溶液 (pH 7.64) 重悬, 加入 DMSO 50 μL 于 -70°C 下保存。

1.3 虾血样品的制备

1% 肝素生理盐水溶液润湿的注射器从围心腔中吸取血淋巴 200 μL 置于 1.5 mL eppendorf 管中, eppendorf 管中已预先加入 500 μL PBS 缓冲液及少量 1% 肝素生理盐水溶液。冰浴, 待测。

1.4 样品测定

实验采用外标定方法。每测一次鸡血参照样, 测 5 个样品。比较样品与鸡血 $2n$ 峰的相对位置, 计算样品细胞核 DNA 含量。在测定过程中各项指标为: 被测溶液的细胞浓度: $10^5 \text{ cell}/\text{L}$; 增益值 (Gain): 600.0。

1.5 数据处理

以鸡血细胞 DNA 含量值为 $2.50 \text{ pg}/2c$ 计算, 虾血细胞的消光值与小公鸡血细胞消光值的比值为 A ; 那么该动物体细胞的绝对 DNA 含量为 $(2.50 \text{ pg}/2c \times A)$ 。

2 结果

2.1 刀额新对虾血液 DNA 含量

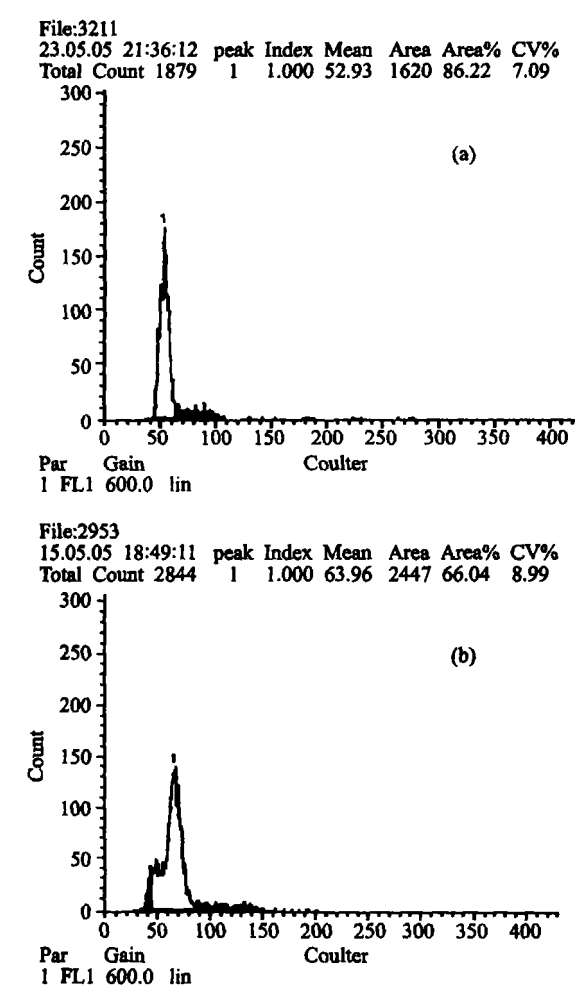


图 1 鸡血细胞 DNA 含量直方图(Gain= 600. 0)
(a): 白毛乌骨鸡; (b): 普通家鸡
Fig. 1 Histogram of erythrocyte DNA content of chicken

国内外相关的研究中, 所用参照标准各有不同, 鸡血 DNA 标准值也不尽相同, 如: $2c= 2.0$ 、 2.3 、 2.8 pg/ $2c$ 等等. 本研究对两种不同小公鸡(白毛乌骨鸡与普通家鸡) 的鸡血进行测定, 以期获得较合适的参照系.

白毛乌骨鸡血液的测量值为: Mean(Coulter) = 52. 93, 而普通家鸡血液测量值为: Mean(Coulter) = 63. 96. 由此可见, 这两种不同小公鸡的血液 DNA 含量是不同的.

张晓军等^[4] 曾对刀额新对虾的 DNA 含量进行测定, 测得刀额新对虾 DNA 含量为小公鸡鸡血 DNA 含量的 1. 75 倍, 并将小公鸡鸡血的 DNA 含量定为 2. 50 pg/ $2c$, 得出刀额新对虾 DNA 含量为 4. 375 pg/ $2c$.

本实验分别以两种小公鸡鸡血作为参照系, 将所测得的刀额新对虾 5 个个体的 Mean(Coulter) 平均值 111. 03(表 1) 与之相比, 得到刀额新对虾细胞核 DNA 含量分别为小公鸡鸡血 DNA 含量的 2. 14 倍(白毛乌骨鸡) 与 1. 77 倍(普通家鸡). 后者与张晓军等^[4] 测得

的 1. 75 倍相近, 为了增加与其数据的可比性, 我们采用普通家鸡鸡血作为参照系, 也同样采用鸡血 DNA 含量为 2. 50 pg/ $2c$, 进而得出本实验中刀额新对虾细胞核 DNA 为 4. 340 pg/ $2c$.

表 1 刀额新对虾血淋巴细胞 DNA 含量的相对值
Tab. 1 Relative DNA content of *Metapenaeus ensis*

样品\项目	Mean(Coulter)	Area/ %	CV/ %
样品平均值	111. 03	78. 05	14. 02
鸡血标准样(乌鸡)	52. 93	86. 22	7. 09
鸡血标准样(家鸡)	63. 96	86. 04	8. 99

2. 2 日本囊对虾血液 DNA 含量

依据上述方法, 可得日本囊对虾的细胞核 DNA 含量为:

$$\text{DNA 含量} = 2. 50 \text{ pg/ } 2c \times (125. 34 \div 64. 24) = 4. 878 \text{ pg/ } 2c$$

表 2 日本囊对虾的血淋巴细胞 DNA 含量的相对值
Tab. 2 Relative DNA content of *Marsupenaeus japonicus*

样品\项目	Mean(Coulter)	Area/ %	CV/ %
样品平均值	125. 34	68. 60	12. 06
鸡血标准样(乌鸡)	54. 20	80. 63	9. 69
鸡血标准样(家鸡)	64. 24	83. 74	11. 29

3 讨 论

随着 DNA 含量测定技术的普及与发展, 越来越多的物种被测定其 DNA 含量, 随之而来的问题是许多学者的研究结果无法进行比较, 正如宋苏祥等^[5] 所提及的因不同作者研究的方法、仪器设备不尽一致, 更重要的是对照标准不同, 使得不同研究结果之间的横向比较无法进行. 常见的对照标准有: 鸡红细胞、人淋巴细胞、鳖红细胞、鲢鱼红细胞及鲑鱼红细胞^[6]. 本研究采用鸡红细胞作为参照标准不仅由于鸡红细胞具有大小均匀、着色性好、来源丰富等特点, 还因为其在不少研究中被广泛采用. 特别是已被报道的刀额新对虾的细胞核 DNA 含量是以鸡红细胞作为参照标准^[4], 为了增加研究结果的可比性, 本研究曾以刀额新对虾为实验对象, 并采用几种不同品种的小公鸡鸡血作为参照样, 所得的测定结果与张晓军等^[4] 报道的结果进行对比, 发现以普通家鸡鸡红细胞作为参照样结果最为接近, 因此采用普通家鸡鸡红细胞作为本研究的参照样.

一般地说, 作为遗传物质基础的 DNA, 在每种生

物细胞中的含量是相当稳定的, 生物的性状就是依赖于 DNA 的稳定复制得以实现世代的遗传和延续. 生物由低等向高等发展, DNA 含量也逐渐增加, 表示了生物体有得到更多基因的可能性, 这是总的演化趋势^[7]. 然而, 进一步的实验发现, 某些两栖类的 C 值甚至比哺乳动物还大, 而在两栖类中 C 值的变化也很大, 可相差 100 倍, 这就是著名的“C 值反常现象(G-value paradox)”, 其中 C 值通常是指一种生物单倍体基因组 DNA 的总量^[8]. 因此, DNA 含量只有在亲缘关系相近的类群中才能作为探讨其演化地位和亲缘关系的参考依据. 本研究中, 日本囊对虾与刀额新对虾 DNA 含量的绝对值相差不大, 可推知两种虾在系统发生上具有相近的亲缘关系, 这与形态学上的分类系统是一致的. 但日本囊对虾 DNA 含量又比刀额新对虾高, 日本囊对虾在进化上是否比刀额新对虾略显高等? 这个问题尚有待今后测定更多种类的 DNA 含量和结合其它测定技术(如流式细胞术、显微 DNA 分析技术等)加以深入的讨论. 一些学者对鱼类^[9]和贝类^[10]的 DNA 含量与其亲缘关系和进化地位的相关性进行过讨论: 叶玉珍等(2004)对 3 个鲫品系的研究表明: 3 个鲫品系的 DNA 含量测定与细胞学结果十分吻合, 相对而言, 染色体数目多的鲫 DNA 含量高, 染色体数目少的鲫 DNA 含量低; 鲫 DNA 含量的高低可能与它的进化程度不同而有密切关系. 吴洪喜等(2000)在对三种蚶 DNA 含量与种间亲缘关系进行探讨后认为: 泥蚶与毛蚶和魁蚶的 DNA 含量相差不大, 表明它们之间的亲缘关系十分接近; 但是, 泥蚶比毛蚶和魁蚶具有稍多的 DNA 含量, 说明泥蚶在进化程度上要

比毛蚶和魁蚶高级. 可以看出, 细胞核 DNA 含量的测定对虾类分类和系统演化的探讨是具有应用前景的, 若再结合其它生物学技术将对以形态学为基础的分类系统起到很好的互相印证作用.

参考文献:

- [1] Bachmann K, Rheinsmith E L. Nuclear DNA amounts in Pacific Crustacea[J]. Chromosoma, 1973, 43: 225–236.
- [2] Rheinsmith E L, Hinegardner R, Bachmann K. Nuclear DNA amounts in Crustacea[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1974, 48B: 343–348.
- [3] Chow S, Dougherty W J, Sandifer P A. Meiotic chromosome complements and nuclear DNA contents of four species of shrimps of the genus *Penaeus*[J]. J Crustacean Biol, 1990, 10(1): 29–36.
- [4] 张晓军, 周岭华, 相建海. 刀额新对虾染色体核型及细胞核 DNA 含量[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(3): 225–231.
- [5] 宋苏祥, 刘洪柏, 孙大江, 等. 施氏鲟的核型及 DNA 含量研究[J]. 遗传, 1997, 19(3): 5–8.
- [6] 宋平根, 李素文. 流式细胞术的原理和应用[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1992.
- [7] 李树深. 脊椎动物的多倍体[J]. 动物学杂志, 1980(2): 52–54.
- [8] 朱玉贤, 李毅. 现代分子生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997.
- [9] 叶玉珍, 周建峰, 王忠卫, 等. 三个鲫品系 DNA 含量的比较研究[J]. 水生生物学报, 2004, 28(1): 13–16.
- [10] 吴洪喜, 柴雪良, 吴建波, 等. 三种蚶 DNA 含量和种间亲缘关系的探讨[J]. 水产科技情报, 2000, 27(2): 51–53.

Measurement and Comparison of Cellular DNA Contents Between *Metapenaeus ensis* and *Marsupenaeus japonicus* (Decapoda: Crustacean)

FANG Lu-ping, ZHANG Fu-hou, CAO Wen-qing, LIN Yuan-shao
(Dept. of Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Using the absolute value of DNA content of chicken erythrocyte (2.50 pg/2c) as a comparative standard, DNA content of *Metapenaeus ensis* and *Marsupenaeus japonicus* were determined by Ploidy Analyser (Partec PA-I, Partec Germany). The absolute DNA contents of the two species were 4.340 pg/2c and 4.878 pg/2c, respectively. The comparative result revealed that the difference between the two species was not apparent in DNA content, which showed that they were quite close to each other in phylogeny based on morphology. Moreover, because the DNA content of *Marsupenaeus japonicus* was somewhat higher than that of *Metapenaeus ensis*, we deduced that the former species was more advanced than the latter in evolutionary relation. This study not only enhanced the function of Ploidy Analyser, but also provided theoretical basis for other studies such as inheritance and breeding research field.

Key words: *Metapenaeus ensis*; *Marsupenaeus japonicus*; cellular DNA content